



EFFECTS OF JUGLONE APPLIED IN PREGERMINATIVE STAGE ON GROWTH OF CUCUMBER SEEDLINGS WITH RESPECT TO PHYSIOLOGICAL AND ANATOMICAL PARAMETERS

İ.TERZİ* & İ. KOCAÇALIŞKAN** & O. BENLİOĞLU***

- *Yrd. Doç. Dr. Dumlupınar Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Eğitimi ABD,
Kütahya - Turkey. E-mail: iterzi@dumlupinar.edu.tr
- **Prof. Dr. Dumlupınar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Kütahya- Turkey. E-mail: ismailkc@dumlupinar.edu.tr
- *** Yrd. Doç. Dr. Dumlupınar Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Kütahya- Turkey.

ABSTRACT

Effects of juglone on seedling growth of cucumber (*Cucumis sativus* cv. Beith Alpha) with respect to physiological and anatomical parameters were investigated. Growth parameters (seedling elongation, fresh and dry weights) were reduced by 1 mM juglone. At the same time, juglone decreased xylem vessel and bundle radius of stem, and number and length of stomata of the cotyledons. But increases in thickness of the cotyledon mesophyll were found. In addition, juglone caused to decrease in protein and chlorophyll content and catecholase and tyrosinase activities. Growth inhibitory effect of juglone was discussed to be related to reduce in anatomic structures such as xylem vessel and stomata rather than the chlorophyll content and the enzyme activities.

Key words: *Anatomy, Cucumber, Enzyme Activity, Juglone, Seedling Growth.*

ÇİMLENME ÖNCESİ UYGULANAN JUGLONUN HIYAR FİDELERİNDE BÜYÜME İLE İLGİLİ FİZYOLOJİK VE ANATOMİK PARAMETRELER ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışmada çimlenme öncesi uygulanan juglonun fizyolojik ve anatomik parametrelerle ilgili olarak hıyar (*Cucumis sativus* cv. Beith Alpha)'ın fide büyümesi üzerine etkileri araştırıldı. Büyüme parametreleri (fide büyümesi, taze ve kuru ağırlık) 1mM juglon tarafından azaltıldı. Aynı zamanda juglon anatomik yapılardan gövdenin trake ve demet çapı ile kotiledonlardaki stoma sayısını ve stoma uzunluğunu azalttı. Buna mukabil kotiledon mezofilinde kalınlaşmalar belirlendi. Ayrıca juglon protein ve klorofil miktarı ile katekolaz ve tirozinaz enzim aktivitelerinde azalmaya sebep oldu. Juglonun büyüme engelleyici etkisinin klorofil miktarı ile enzim aktivitelerinden ziyade trake ve stoma gibi anatomik yapılardaki indirgenme ile ilgili olabileceği tartışıldı.

Anahtar Kelimeler: *Fide Büyümesi, Hıyar, Juglon, Katekolaz, Tirozinaz.*

1.GİRİŞ

Juglon ekolojik öneme sahip bir allelokimyasal maddedir. Çünkü juglon ceviz ağaçlarının yaprak ve köklerinden çevreye salınan toksik karakterli bir madde olduğundan ceviz ağaçlarının dibinde ve yakınında bir çok bitki türü gelişmemekte hatta kurumaktadır. Bunun yanında bazı bitki türleri nadir de olsa juglondan olumlu etkilenmektedir [1,2,3]. Ceviz ağaçlarının dünyada çok yaygın olarak bulunmasından ve juglonun allelopatik özelliğe sahip olmasından dolayı onun ekolojik önemini artırmaktadır. Juglon bütün ceviz türlerinde bulunmakla birlikte en çok *Juglans nigra* ve ülkemizde en yaygın ceviz türü olan *Juglans regia* da bulunduğu belirtilmektedir [4,5]. Hidrojuglon olarak adlandırılan renksiz, toksik olmayan, indirgenmiş form, özellikle yapraklarda, meyve kabuklarında ve ceviz köklerinde boldur. Hidrojuglon cevizden dışarı salgılandığında hava ile temas ederek oksitlenmeye maruz kaldığında toksik formu olan juglona dönüşür [6,7]. Yaprakların yağmur sularıyla yıkanmasıyla toprağa taşınır. Böylece, ceviz ağacından salınan juglonun komşu bitkilerin kökleri tarafından absorbe edilmesiyle komşu bitkiler olumlu veya olumsuz etkilenmektedir [8]. Ceviz ağacından salgılanan juglonun hem odunsu hem de otsu bitkiler üzerine toksik olduğu rapor edilmiştir [9,8].

Juglonun bitkiler üzerine allelopatik etkileri genelde toksiktir, fakat nadiren yararlıdır. Önceki çalışmamızda, domates, hıyar, tere ve yoncanın fide büyümesinin juglon ve ceviz yaprak özütleri tarafından güçlü bir şekilde engellendiği, fakat kavun fide büyümesinin bu uygulamayla arttığı tespit edilmiştir [10].

Juglonun fizyolojik etkisi tam olarak anlaşılammıştır. Juglonun tohum çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine olan etkisi hakkında bir kaç çalışma yapılmıştır. Juglonun solunum ve fotosentezi azaltarak bitki büyümesini engellediği [11,12] ve oksidatif stresi artırmasıyla, oksitleyici enzimlerin aktivitelerini artırdığı belirlenmiştir [7].

Juglonun anatomik parametreler üzerine etkileri hakkında ise herhangi bir çalışmaya rastlayamamıştır. Bu yüzden daha önce hıyar üzerinde juglonun olumsuz etkisini belirlediğimiz çalışmamız esas alınarak, bu kimyasalın, hıyar fidelerindeki büyümeyi engelleyici etkisininin anatomik ve fizyolojik parametrelerle ilgisini araştırdık.

2.MATERYAL VE METOD

Hıyar tohumları (*Cucumis sativus* cv. Beith Alpha) BURSA TOHUMCULUK A. Ş. 'den temin edilmiştir. Tohumlar kullanılmadan önce yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuştur. Bunun için tohumlar % 1'lik sodyum hipokloritte 10 dakika bırakıldıktan sonra beş defa saf su ile yıkanıp filtre kağıtları üzerinde oda sıcaklığında kurutulmuştur [13].

Bu tohumlar içerisinden dolgun, sağlam görünümlü ve benzer büyüklükte olan tohumlar seçilip önceden hazırlanmış olan 12 cm çaplı petri kutularına düzenli bir şekilde ve yaklaşık 2cm aralıklarla ekilmişlerdir. Petri kutuları tohum ekiminden önce etüvde 115 °C de sterilize edilip tabanına 2 katlı filtre kağıda yerleştirilmiştir. Petrilere yapılacak muameleye göre gruplandırılmıştır. Petrilere 1mM juglon (SIGMA) ve saf su (kontrol) ilave edilerek

ekim yapılmıştır. Çünkü juglon ceviz altı toprağında bu konsantrasyonda bulunmaktadır [8].

Her petriye 20 tohum olacak şekilde ekim yapıp petriler iklim dolabına yerleştirilmiştir. Kabinin iklim şartları “14 saat ışık (20 000 lüx), 24 °C sıcaklık, % 70 nispi nem” ve “10 saat karanlık, 18 °C sıcaklık, % 80 nispi nem” olarak ayarlanmıştır [14]. Tohumlar bu şartlarda 11 gün boyunca kök ve gövde gelişene kadar çimlenmeye bırakılmıştır. Tüm deneyler 3 kez tekrarlanmıştır.

2.1 Kök ve Gövde Uzunlukları ile Taze ve Kuru Ağırlık Tayini

Kontrol fidelerinde kök ve gövdenin yeterli gelişmesi 11. günde olduğundan, 11. gün sonunda kök ve gövde birleşme yerlerinden jiletle kesilen fidelerin uzunlukları bir cetvel yardımıyla ölçülmüştür [15]. Bir petrideki köklerin uzunlukları toplamının tohum sayısına bölünmesiyle ortalama kök uzunluğu “cm / fide” olarak hesaplanmıştır. Ortalama gövde uzunluğu da aynı şekilde belirlenmiştir. Ortalama taze ağırlık, bir petrideki toplam kök veya gövde taze ağırlıklarının tohum sayısına bölünmesiyle “mg / fide” olarak tespit edilmiştir. Ortalama kuru ağırlık da aynı şekilde belirlenmiştir.

2.2 Klorofil ve Karotinoid Miktarı Tayini

Hıyar kotiledonlarındaki pigment miktarı Arnon (1949)’a göre spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Bu amaçla 0,05 g kotiledon 5 ml % 80 aseton içerisinde havanda homojenize edilip tülbent bezinden süzülükten sonra masa santrifüjünde 15 dk. süreyle 3500x g hızda santrifüjlenmiştir. Daha sonra süpernatant % 80 aseton ile 10 ml’ ye tamamlanmıştır. Bu örneğin spektrofotometrede 645, 663, 450 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen değerler aşağıdaki denklemlerde yerine konarak klorofil ve karotinoid miktarları önce “mg / l” cinsinden daha sonra “mg / g taze kotiledon” cinsinden hesaplanmıştır.

$$\text{Klorofil a (mg/l)} = 12,7x A_{663} - 2,69x A_{645}$$

$$\text{Klorofil b (mg/l)} = 22,9x A_{645} - 4,68x A_{663}$$

$$\text{Karotinoid (mg/l)} = 4,07x A_{450} - (0,0435 x \text{klorofil a mg/l} + 0,367 x \text{klorofil b mg/l})$$

2.3 Özüt Hazırlanması

Büyütülen hıyar fidelerinin kotiledonları jilet yardımı ile gövdeden ayrılmış ve daha sonra ayrılan kotiledonların taze ağırlığı hassas terazide tartılıp kaydedilmiştir. Bundan sonra bir miktar kotiledon dokusu ağırlığının 10 katı hacimde fosfat tamponunda (0,1M; pH=6,5) soğutulmuş havan içerisinde ezilerek homojenize edilmiştir. Elde edilen özüt buzdolabında soğutulan bir beher içerisine tülbent bezinden süzümüştür. Elde edilen süzüntü yine buzdolabında soğutulan santrifüj tüplerine aktararak 3500x g hızda 10 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda elde edilen sıvı kısım (süpernatant) buzdolabına konmuş ve daha sonra protein miktarı ve polifenol oksidaz (PFO) enzim aktiviteleri ölçümleri için kullanılmıştır.

2.4 Protein Miktarı Tayini

Yukarıdaki şekilde hazırlanan özütlerdeki çözünebilir protein miktarı, spektrofotometrik olarak coomassie yöntemiyle tayin edilmiştir [17]. Bitki kotiledonlarından elde edilen ve buzdolabına konan özütten 0,1ml alınarak benzer şekilde coomassie reaktifi ile karıştırıldıktan sonra 595 nm'de absorbanı ölçülüp, standart grafik üzerinden protein miktarları önce protein "µg / 0,1 ml özüt" olarak sonra protein "mg / g taze kotiledon" olarak belirlenmiştir.

2.5 Katekol Oksidaz Aktivitesi

10 mM'lık katekol çözeltisinden 1,5 ml alınıp deney tüpü içerisine konuldu. Üzerine hazırladığımız ve buzdolabında bekleterek soğuttuğumuz enzim özütünden 0,2 ml ve fosfat tamponundan 2 ml ilave edildi. Bu karışım 37 °C ye ayarladığımız su banyosu (benmari) içerisinde 2 dakika bekletildi. 2. dakikanın sonunda spektrofotometrede 430 nm de absorban değeri ölçüldü ve katekolaz aktivitesi " A₄₃₀ / g kotiledon" olarak belirlendi [18].

2.6 Tirozinaz Aktivitesi

10 mM'lık tirozin çözeltisinden 1,5 ml alınıp deney tüpü içerisine konuldu. Üzerine enzim özütünden 0,4 ml ve fosfat tamponundan 2 ml ilave edildi ve 37 °C de beklettiğimiz su banyosunda 2 saat bekletildi. 2 saat sonunda absorban değeri 430 nm de ölçüldü. Tirozinaz aktivitesi "A₄₃₀ / g kotiledon" olarak ifade edildi [18].

2.8 Anatomik Kesitler

İklim dolabında büyütülen hıyar fidelerinin bir kısmı anatomik kesitler almak amacıyla renkli şişelerde %70'lik alkole alındı. Daha sonra stoma boyu, stoma sayısı, mezofil kalınlığı, palizat kalınlığı, trake çapı ve demet çapı ölçümleri için kesitler alındı. Kesitler gliserin- jelaatin ortamında sabit preperat haline getirildi ve Zeiss marka araştırma mikroskobunda incelenerek gerekli ölçümler yapıldı.

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada juglonun hıyar fide büyümesi üzerine etki şekli fizyolojik ve anatomik parametreleriyle kıyaslanarak incelendi. Fide uzaması, taze ve kuru ağırlıklar gibi tüm büyüme parametreleri juglon ile önemli bir şekilde azaldı. Özellikle taze ve kuru ağırlıklar daha olumsuz etkilendi (Tablo 1).

Diğer taraftan çalışmamızda juglon hem klorofil-a ve hem de klorofil-b miktarını azaltırken karotinoid miktarını artırmıştır. Hıyarda juglonun klorofil miktarını azalttığı önceden belirlenmiştir [19]. Ancak karotinoid miktarı üzerinde juglonun etkisi ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bununla beraber genelde fizyolojik olarak klorofilin azalması durumunda

karotinoid miktarının artış gösterdiği bilinmektedir [20]. Bir raporda, juglonun *Lemna minor*'daki klorofil miktarını ve fotosentezi azaltarak büyümeyi engellediği bulunmuştur. Fakat bu engellemenin klorofil kaybından ziyade kloroplastın fotosentetik elektron transportundaki engelleme ile ilgili olduğu belirtilmiştir [11]. Çalışmamızda, klorofil miktarının juglon tarafından önemli bir şekilde azaltılmasına rağmen bu etkinin juglonun büyümeyi engelleyici etkisiyle bağlantılı olamayacağı söylenebilir. Çünkü juglonun aynı zamanda karanlıkta hıyar fide büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir [10]. Eğer juglonun büyüme engelleyici etkisi klorofil miktarı ile doğrudan ilgili olsaydı karanlıkta büyütülen fidelerde büyümeyi engellememesi gerekirdi. Çünkü karanlıkta klorofil oluşumu söz konusu değildir. Protein miktarı da juglon tarafından olumsuz yönde etkilenmiştir (Tablo 1). Genelde büyüme ile protein sentezi arasında doğru bir ilgi vardır [21]. Ayrıca bitki büyümesinde hormonların düzenleyici etkisi olduğu bilinmektedir. Juglonun büyümeyi teşvik edici hormonların sentezini engelleyip ABA gibi engelleyici hormonların sentezini teşvik etmek suretiyle hıyarda büyümeyi engellemiş olması da muhtemeldir

Katekolaz ve tirozinaz enzimleri juglon uygulamasında kontrole göre düşük aktivite göstermişlerdir (Tablo 1). Bu enzimler genellikle stres şartlarında yüksek aktivite gösteren enzimlerdir [22]. Burada düşük aktivite göstermeleri juglonun hıyarda çimlenme öncesi uygulandığında, enzimleri aktive edecek düzeyde önemli bir strese sebep olmadığını düşündürmektedir.

Kontrol fidelerinin kotiledonlarındaki palizat tabakası iki iken, juglonla muamele edilmiş olan fidelerin kotiledonlarındaki palizat tabakası üç sıralıdır. Yine, juglon muamelesindeki kotiledonların mezofil dokusu kontrolden çok daha kalındır. Bu değişim juglonun sebep olduğu allelokimyasal strese bir tepki olarak ortaya çıkmış olabilir. Çünkü stres şartlarında yaprakların kalınlaştığı belirtilmiştir [22]. Juglon'un bir çok bitkide allelokimyasal strese sebep olduğu da bilinmektedir [7]. Bununla beraber bir stresin bitkide hangi fizyolojik olayları etkileyeceği stresin derecesine ve bitki türüne göre farklılık gösterir [22]. Nitekim bu çalışmada juglon uygulanan fidelerde enzim aktiviteleri düşük kalırken kotiledon kalınlığı artmıştır.

Bununla beraber, anatomik parametrelerden gövde trake çapı, demet çapı ve kotiledonların stoma boyu ve stoma sayılarının fide büyümesiyle paralellik gösterdiği tespit edildi (Tablo 1). Şöyle ki, juglon etkisiyle fide büyümesinin olumsuz etkilenmesi anatomik parametreleri de aynı şekilde olumsuz etkilemiştir. Juglon, ksilem borularını daraltarak fidenin daha az su almasına sebep olabilir. Bu da büyümeyi olumsuz etkiler. Diğer taraftan, juglon etkisiyle stoma boyu ve stoma sayısının azalması da büyümede azalmaya sebep olabilir. Çünkü stomalar fotosentez için gerekli CO₂' in giriş kapılarıdır. Bundaki azalma fotosentezi ve dolayısıyla bitki büyümesini olumsuz etkileyecektir. Zira bitkilerin anatomik yapıları ile fizyolojileri arasında sıkı bir ilgi vardır [23].

KAYNAKLAR

- [1] Davis E F (1928) The toxic principle of *Juglans nigra* as identified with synthetic juglone and its toxic effects on tomato and alfalfa plants. *American Journal of Botany*, 15, 620-621.
- [2] Rice E L (1984) *Allelopathy*, Academic Press New York. 422 pp.
- [3] Kocaçalışkan I, (2001) *Allelopati*, Bizim Büro Basımevi, Ankara, 132 s.
- [4] Daglish C (1950) The isolation and identification of a hydrojuglone glycoside occurring in the walnut. *Biochemistry Journal*, 47, 452-457.
- [5] Prativiera A G, Kuniyuki A H, Ryugo K (1983) Growth inhibitors in xylem exudates of Persian walnuts (*Juglans regia* L.) and their possible role in graft failure. *Journal American Society Horticultural Science*, 108, 1043-1045.
- [6] Lee K C, Campbell R W (1969) Nature and occurrence of juglone in *Juglans nigra* L. *Horticultural Science*, 4, 297-298.
- [7] Segura-Aguilar J, Hakman I, Rydström J (1992) The effect of 5 OH- 1,4-Naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination. *Plant Physiology*, 100, 1955-1961
- [8] Rietveld W J (1983) Allelopathic effects of juglone on germination and growth of several herbaceous and woody species. *Journal of Chemical Ecology*, 9, 295-308.
- [9] Funk D T, Case P J, Rietveld W J, Phlares R E (1979) Effects of juglone on the growth of coniferous seedlings. *Forest Science*, 25, 452- 454.
- [10] Kocaçalışkan I, Terzi I (2001) Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 76, 436- 440.
- [11] Hejl A M, Einhellig F A, Rasmussen J A (1993) Effects of juglone on growth, photosynthesis and respiration. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 559-568.
- [12] Jose S, Gillespie A R (1998) Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping: II. Effects of juglone on hydroponically grown corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L. Merr.) growth and physiology. *Plant and Soil*, 203, 199-205.
- [13] Baltepe Ş, Mert H H (1973) Bazı *Cucurbita* Türlerinin Hipokotil Büyümesi üzerinde

Giberellik Asit ve İndol Asetik asitin etkileri. *Tübitak IV. Bilim Kongresi*, Ankara, 1- 4.

- [14] Şeniz V (1993) *Genel Sebzeçilik*, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Ders Notları No: 53, 230 sayfa.
- [15] Piedrahita O (1984) Black walnut toxicity. *Factsheet*, 11, 7-8.
- [16] Arnon D I (1949) Copper enzymes in isolated chloroplast Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24, 1-15.
- [17] Bradford M M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [18] Kabar K, Kocaçalışkan I (1990) Interactions among salinity (NaCl), Polyphenol oxidase and growth regulators in the germination of wheat seeds. *Turkish Journal of Botany*, 14, 235-245.
- [19] Tekintaş E, Tanrısever A, Mendilcioğlu K (1988) Juglonun tohum çimlenmesine etkileri üzerine bir araştırma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 25, 203-213.
- [20] Vardar Y (1975) *Bitki Fizyolojisi Dersleri II*. Fen Fakültesi yayın no: 69, 221 sayfa.
- [21] Salisburg R, Ross C W (1992) *Plant Physiology*, Wordsworth. Pulb.Comp., Belmont, California, 682 pp.
- [22] Hale, M G, Orcutt D M (1987) *The physiology of plants under stress*, Blacksburg, Virginia, USA, 117-127.
- [23] Bidwell R G S (1979) *Plant Physiology*, Collier macmillan publisher, London. P.727

Tablo 1. Juglonun hıyar fidelerinin büyümesi ile bazı fizyolojik ve anatomik parametreler üzerine etkileri.

	Kontrol (Saf su)	Juglon (1mM)
<i>Büyüme parametreleri</i>		
Fide uzaması (cm)	16,1± 0,15	10,5*± 0,15
Fide taze ağırlık (mg)	414,0± 17,27	150,0*± 15,27
Fide kuru ağırlık (mg)	13,7± 0,25	4,1*± 0,26
<i>Pigment ve protein miktarı</i>		
Klorofil a (mg/g kotiledon)	0,86± 0,011	0,74± 0,005
Klorofil b (mg/g kotiledon)	0,81± 0,015	0,63*± 0,020
Karotinoid (mg/g kotiledon)	0,18± 0,012	0,48± 0,021
Protein (mg/g kotiledon)	13,7± 0,090	11,0± 0,450
<i>Enzim aktivitesi</i>		
Katekolaz (A430 /g kotiledon)	7,45± 0,12	5,65± 0,13
Tirozinaz (A430 /g kotiledon)	1,85± 0,16	0,45± 0,12
<i>Anatomik parametreler</i>		
Gövde trake çapı (µm)	34,0± 1,45	16,8± 1,11
Gövde demet çapı (µm)	320,9± 14,40	291,4± 7,45
Kotiledon stoma uzunluğu (µm)	17,2± 1,07	15,6± 2,06
Kotiledon stoma sayısı / m ²	691± 9,85	448± 3,24
Kotiledon mezofil kalınlığı (µm)	420,2± 18,23	443,2± 5,47
Kotiledon palizat kalınlığı (hücre sırası)	2± 0,00	3± 0,00

* t (P < 0,05) ± SD